

令和元年6月12日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06592

研究課題名(和文) 多種の脳内神経伝達物質を同時検出するための蛍光プローブの創製と医療診断への展開

研究課題名(英文) Developments of fluorescent molecular probes for the simultaneous detections of various neurotransmitters and application to medical diagnosis

研究代表者

鈴木 祥夫 (Suzuki, Yoshio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60321907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達物質として知られているドーパミンまたはオキシトシンを選択的に検出するための蛍光分子プローブの設計・合成および性能評価を行った。分子設計にあたり、ドーパミン認識部位として遷移金属イオンから成る錯体、オキシトシン認識部位として24のアミノ酸残基から構成されるペプチドを用いた。これらの分子を用いることにより、上記神経伝達物質の高感度かつ高選択的な検出が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、開発した分析試薬を用いることにより、これまで計測が困難であった神経伝達物質の高感度かつ高選択的検出が可能になったという分析化学分野の発展に繋がる学術的に意義のある成果である。さらに、神経伝達物質の動的挙動をリアルタイムで計測出来る技術にも繋がり、現在根本的な治療法が確立していない神経変性疾患に対する理解が深まる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent reagents, which have transition metal complex as recognition site for dopamine, peptides as recognition site of oxytocin and fluorophore such as cyanopyranyl moiety have been developed for the selective detection of neurotransmitters. These compounds indicated weak fluorescence, whereas strong emission was observed after addition of target neurotransmitters. The increases of fluorescence intensities were concentration-dependent, from which a good linear relationships were observed by plotting the data as a function of neurotransmitters concentrations. The bindings and detections of fluorescent probes with target neurotransmitters were not affected by the presence of foreign substances, thereby allowing for the highly selective detection of neurotransmitters. These fluorescent probes can be broadly employed in detection protocols of neurotransmitters by the scientific community in diverse areas of research.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光 センサー 分子プローブ 神経伝達物質 分子設計

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物の行動および精神は、数多くの神経伝達物質によりコントロールされている。これらの神経伝達物質は適当な量、適当なタイミングで分泌されることが重要であり、そのバランスが崩れると様々な疾病や日常生活を困難にする状況が引き起こされる。中でもドーパミンは、人間の情動・運動・意欲・学習・薬物依存に係る重要な神経伝達物質であり、現在根本的な治療法が確立していないパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患に対してもドーパミンが関与していることが知られている。また、同じく神経伝達物質の一つであるオキシトシンは、中枢神経および末梢組織に存在するペプチドであり、ストレスの軽減、良好な対人関係の構築等に関与する効果があるほか、現在根本的な治療法が確立していない認知症による徘徊の低減、高血圧患者に対する血圧の低下の効果などに対してもオキシトシンが関与していることが知られている。このため、ドーパミン、オキシトシンを選択的に可視化イメージング出来る分子プローブを開発することは、神経伝達物質の挙動を計測することによって、脳神経に関する理解が深まると同時に、神経変性疾患の早期診断に繋がる可能性を秘めるなど極めて重要な技術である。

### 2. 研究の目的

脳内の化学的情報伝達に関与する代表的な2種類の神経伝達物質(ドーパミンとオキシトシン)を同時認識し、可視化イメージングを行うことが出来る新規蛍光分子プローブの設計・合成およびその性能評価を行う。さらに、開発した試薬の応用として、神経細胞間の化学的情報処理のメカニズムの解明および神経内科疾患の早期診断への適用の可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

新規蛍光分子プローブの設計・合成にあたり、ドーパミンに対してはイミノ二酢酸-鉄錯体、オキシトシンに対してはオキシトシン受容体を模倣したオリゴペプチドを認識部位として採用した。さらに上記認識部位に蛍光発色団を導入する上で、標的物質(ドーパミンおよびオキシトシン)との反応前後において蛍光強度が大きく変化すること、ドーパミンとオキシトシンを2種類の分子プローブで同時に検出するため(最終的には1種類の分子プローブで同時検出を実施)、各々のプローブの励起波長および蛍光波長が重ならないこと、を考慮し、ドーパミン検出用蛍光分子プローブにおいては、蛍光発色団としてシアノピラニル基等を有し、ドーパミン認識部位としてイミノ二酢酸-鉄錯体を併せ持つ複数の化合物を系統的に合成した(化合物1)。また、オキシトシン検出用分子プローブについては、認識部位としてオリゴペプチドを、蛍光発色団として標的物質との相互作用による分子内のICT状態の変化によって強い蛍光発光を示すダンシル基を有する化合物を系統的に合成した(化合物2)。合成した化合物の確認は、<sup>1</sup>H-NMR、質量分析を用いて行った。

また、合成した蛍光分子プローブと標的物質との反応の評価については、ドーパミンまたはオキシトシンを特異的に認識するかどうかを、蛍光光度法を用いて確認し、解離定数等の熱力学的パラメータの算出、妨害物質の影響などについて検討した。

### 4. 研究成果

化合物1単独では蛍光が消光状態にあるが、ドーパミンを添加した時のみ蛍光強度の増加が観察された(図2)。これは、化合物1にFe(II)を添加すると、錯体を形成することによって、化合物1の蛍光が消光する。この状態に、ドーパミンを添加すると、図3に示したように、ドーパミンとFe(II)が複合体を形成することによって、Fe(II)が化合物1から脱離し、化合物1の

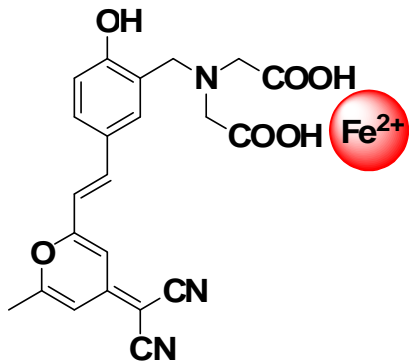


図1 化合物1の構造

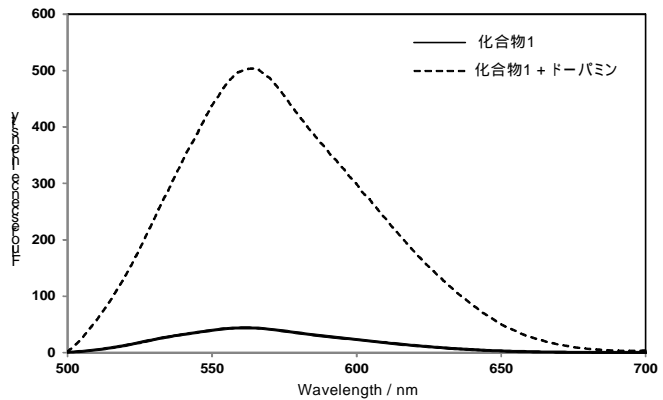


図2 ドーパミン添加前後における化合物1の蛍光スペクトル

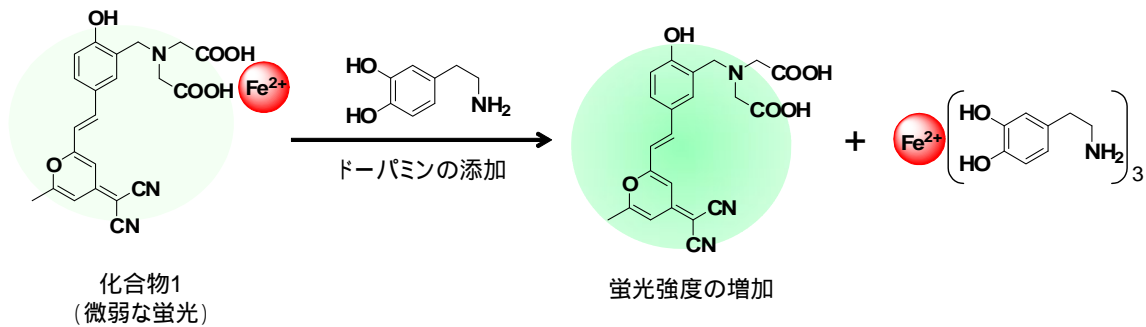


図3 化合物1とドーパミンの反応の模式図

蛍光が回復したためであると考えられる。また、他のカテコールアミン類等を添加しても蛍光の変化は観察されなかったことから、ドーパミンの選択的検出が示唆された。

また、化合物2についてもオキシトシンに対する認識を評価したところ、化合物2単独では蛍光が消光状態にあるが、オキシトシンを添加した時のみ蛍光強度の増加が観察された。また、様々な妨害物質を添加しても蛍光の変化は観察されなかったことから、オキシトシンの選択的検出が示唆された。さらに、磁気ビーズ表面に開発した化合物を修飾することにより、未修飾状態での分析よりも検出感度の向上が見られたほか、血清中でのオキシトシン認識が可能となった。

以上の結果から、開発した試薬を用いることにより上記神経伝達物質の高感度かつ高選択的検出が可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

鈴木 祥夫, Development of a fluorescent peptide for the highly sensitive and selective detection of vascular endothelial  
SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, 査読有, 276, 2018, pp.230-237.  
10.1016/j.snb.2018.08.108.

鈴木 祥夫, Development of a Fluorescent Peptide for the Highly Sensitive and Selective Detection of Oxytocin, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, 査読有, 254, 2018, pp.321-328.  
10.1016/j.snb.2017.07.080.

鈴木 祥夫, Design and Synthesis of Fluorescent Reagents for Selective Detection of Dopamine, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, 査読有, 239, 2016, pp.383-389.  
10.1016/j.snb.2016.08.019.

鈴木 祥夫, 横山 憲二, Development of Functional Fluorescent Molecular Probes for the Detection of Biological Substances, Biosensors, 査読有, 5, 2015, pp.337-363.  
10.3390/bios5020337.

鈴木 祥夫, 久野 敦, 千葉 靖, Development of fluorescent probes for “On-Off” switching based detection of lectin–saccharide interactions, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL , 査読有, 220 , 2015, pp.389-397、2015.  
10.1016/j.snb.2015.05.041.

〔学会発表〕(計10件)

鈴木 祥夫, 神経伝達物質を高感度検出するための新規蛍光分子プローブの創製, 第16回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム, 2018

鈴木 祥夫, Developments of Novel Fluorescent Molecular Probes for the Selective Detection of Neurotransmitters, ACS National Meeting & Expo, 2018

鈴木 祥夫, Developments of Fluorescent Reagents for the Selective Detection of Neurotransmitters, BIT's 9th World Gene Convention-2018, 2018

鈴木 祥夫, Development of Fluorescent Molecular Probes for the Highly Sensitive Detection of Proteins and Glycoconjugates, BIT's 8th World Gene Convention-2017, 2017

鈴木 祥夫, Developments of Fluorescent Reagents for the Selective Detection of Neurotransmitters, 2017 RACI Centenary Congress, 2017

鈴木 祥夫, 田中 睦生, 神経伝達物質を選択的に検出するための新規蛍光分子プローブの創製, 2017年光化学討論会, 2017

鈴木 祥夫, 田中 睦生, 神経伝達物質を選択的に検出するための新規蛍光分析試薬の開発, 第77回分析化学討論会, 2017

鈴木 祥夫, Development of Fluorescent Magnetic Particles for “On-Off” Switching based Detection of Various Lectin-Saccharide Interactions, BIT's 9th Annual World Protein & Peptide Conference, 2016.

鈴木 祥夫, ドーパミンを選択的に検出するための新規蛍光物質の創製, 第14回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 2016.

鈴木 祥夫, 長坂 和明, 高島 一郎, 山本 慎也, ドーパミンを選択的に検出するための新規蛍光分子プローブの開発, 日本化学会 第96春季年会 (2016), 2016.

〔図書〕(計1件)

鈴木 祥夫, 株式会社テクノシステム, 材料表面の親水・親油の評価と制御設計, 2016, 600.

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 生体分子検出用蛍光物質

発明者: 鈴木祥夫

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2017-039176

出願年: 2017

国内外の別: 国内

名称: ドーパミン検出用蛍光物質

発明者: 鈴木祥夫, 山本慎也, 長坂和明, 高島一郎

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2015-233571

出願年: 2015

国内外の別: 国内

名称: 神経伝達物質イメージング方法

発明者: 山本慎也, 鈴木祥夫, 長坂和明, 高島一郎

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2015-233488

出願年: 2015

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。